

# Progrès réalisés dans la régénération des protoplastes de bananiers

(*Musa* spp.)

A. Assani<sup>1-3</sup>

R. Haïcour<sup>1</sup>

F. Bakry<sup>2</sup>

B. Foroughi-Wehr<sup>3</sup>

## Introduction

Les bananes et plantains jouent un grand rôle dans l'alimentation de base des populations des pays tropicaux. Ils occupent la quatrième place pour la production de fruits au monde, et la deuxième place en ce qui concerne le commerce des fruits. Comme la plupart des plantes cultivées, le bananier est menacé par un certain nombre d'agents pathogènes et de ravageurs (Perrier, 1992). La création de nouvelles variétés résistantes aux maladies et ravageurs avec des fruits

---

<sup>1</sup> Laboratoire de Morphogenèse végétale expérimentale, bât. 360, université Paris Sud XI, F-91405 Orsay cedex, France.

<sup>2</sup> Cirad-FIhor, av. du Val Montferrand, BP 5035, F-34032 Montpellier cedex, France.

<sup>3</sup> Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, IRG, Graf-Seinsheim-Str. 23, D-85461 Grünbach, Allemagne.

de bonne qualité (meilleur contrôle du mûrissement, goût, forme, couleur, rigidité de la pulpe, etc.) s'avère nécessaire.

Les travaux d'amélioration par les méthodes classiques de croisements se heurtent souvent aux problèmes de stérilité qui caractérisent la plupart des génotypes (Stover et Simmonds, 1987). Malgré les succès obtenus dans la création de nouvelles variétés par les hybridations classiques (Bakry et Horry, 1992 ; Vuylsteke *et al.*, 1993), la plupart des génotypes d'importance économique ne sont que des produits issus d'une simple sélection. L'industrialisation de la culture bananière a engendré une diminution considérable de la variabilité génétique. La fusion somatique, c'est-à-dire la fusion des protoplastes, devrait permettre de contourner les barrières de stérilité, d'augmenter la variabilité génétique et de mieux comprendre la génétique du cytoplasme ainsi que les interactions entre le cytoplasme et le noyau.

La fusion somatique nécessite la maîtrise du comportement des protoplastes depuis leur isolement jusqu'à leur régénération en plantes. Les protoplastes peuvent être obtenus à partir des feuilles, de cals et des suspensions cellulaires. Chez la plupart des Monocotyledones dont font partie les bananiers, les suspensions cellulaires constituent le matériel de choix pour l'isolement des protoplastes. Des suspensions cellulaires peuvent être obtenues à partir des tissus de rhizomes et du pseudo tronc (Novak *et al.*, 1989), de l'apex caulinaire (Dhed'a *et al.*, 1991), des jeunes fleurs mâles (Ma, 1991 ; Grapin *et al.*, 1996, Côte *et al.*, 1996), des embryons zygotiques immatures (Marroquin *et al.*, 1993). Les premiers travaux concernant l'isolement et l'obtention de la division chez les cellules issues de protoplastes du bananier ont été rapportés respectivement par Bakry (1984) et Matsumoto *et al.* (1988). La régénération de plantes à partir de protoplastes a été obtenue par Megia *et al.* (1993) et Panis *et al.* (1993) chez le même cultivar *Bluggoe* (ABB).

Le présent article rapporte sur la mise au point d'une méthode permettant la régénération de plantes à partir de protoplastes issus de plusieurs cultivars d'importance économique.

## I Matériel végétal

Le matériel de base utilisé pour l'isolement des protoplastes est constitué de feuilles, de cals, et de suspensions cellulaires embryogènes. Les suspensions cellulaires ont été obtenues chez les génotypes *Grande Naine* (AAA), *Gros Michel* (AAA), *SF 265* (AA), *Col 49* (AA), *IRFA 903* (AA), *Currare Enano* (AAB) et *Dominico* (AAB). Des cals haploïdes ont été initiés à partir des cultures d'anthers chez les génotypes *Pisang batu* (BB), *Pisang klutuk wulung* (BB) et *Pisang klutuk* (BB). Les feuilles de vitro plants haploïdes du dernier génotype ont également été utilisées pour isoler les protoplastes, ainsi que les feuilles du génotype *Tani* (diploïde BB) et *Colatino Ouro* (diploïde AA).

## I Méthodes

### *Entretien et maintien du matériel utilisé in vitro*

Toutes les suspensions cellulaires ont été initiées à partir des jeunes fleurs mâles. La méthode d'initiation est celle décrite par Ma (1991), Grapin *et al.* (1996), Côte *et al.* (1996). Les suspensions cellulaires sont maintenues et multipliées sur le milieu M<sub>2</sub>. Ce milieu est basiquement celui de Murashige et Skoog (1962) additionné de 1 mg.l<sup>-1</sup> d'acide 2,4 D dichlorophénoxyacétique (2,4 D), 2,5 mg.l<sup>-1</sup> de biotine, 100 mg.l<sup>-1</sup> de myoinositol, 100 mg.l<sup>-1</sup> de glutamine, 100 mg.l<sup>-1</sup> d'extrait de malt (Sigma) et de 15 g.l<sup>-1</sup> de saccharose. Les cals haploïdes ont été initiés à partir des anthers des inflorescences mâles (Kerbelec, 1996) ; ces cals sont maintenus sur milieu MS modifié contenant 500 mg.l<sup>-1</sup> d'hydrolysate de caséine, 2 mg.l<sup>-1</sup> d'acide 3-indole acétique (AIA), 2 mg.l<sup>-1</sup> de benzyladénine (BA), vitamines de Morel (Morel et Wetmore, 1951). Les plantes *in vitro* sont maintenues sur milieu MS additionné de 100 mg.l<sup>-1</sup> de myoinositol, 1 g.l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (Möllers et Wenzel, 1992). Les suspensions embryogènes doivent être subcultivées sur du milieu frais tous les

10 jours. Les cals et les vitro plants sont repiqués tous les 30 jours à raison d'un explant par contenant.

### **P**rotoplastes de suspensions cellulaires

2 à 3 jours après une subculture, les suspensions cellulaires sont filtrées à l'aide d'un double tamis, fixé à une tulipe. Le diamètre des mailles est de 500  $\mu\text{m}$  pour le tamis supérieur et de 200  $\mu\text{m}$  pour l'inférieur. Le filtrat est recueilli dans une boîte de Pétri : 5 ml de la solution enzymatique EC<sub>1</sub> sont mélangés avec 1 ml de volume de cellules décantées. La solution enzymatique EC<sub>1</sub> est composée de 1,5 % de cellulase RS, 0,15 % de pectolyase, 3 % de KCl et 0,5 % de CaCl<sub>2</sub>. La macération ainsi obtenue est placée à l'obscurité, à une température de 27 °C pendant 12 h-14 h.

### **P**rotoplastes de cals et de feuilles

Des cals en croissance active, âgés de 4 semaines après la dernière subculture, ou des jeunes feuilles prélevées sur des vitro plants repiqués depuis 4-5 semaines sont utilisés pour fournir des protoplastes. Ces matériels sont découpés à l'aide d'un scalpel en tranches fines de 1 mm d'épaisseur et rapidement placés en erlenmeyer de 150 ml muni d'un bec latéral. Cette ouverture est raccordée à un filtre millipore de 0,22  $\mu\text{m}$  de diamètre.

Pour chaque gramme de cal ou de feuille, on ajoute 10 ml de solution enzymatique. La macération des fragments de cals est réalisée à l'aide de la solution enzymatique EC<sub>2</sub> composée de 1,5 % de cellulase RS, 0,15 % de pectolyase, 1 % de macérozyme, 3 % de KCl, 0,5 % de CaCl<sub>2</sub>. Pour la macération des feuilles, on utilise la solution enzymatique EC<sub>3</sub> composée de 1 % de cellulase RS, 0,15 % de pectolyase, 1 % de macérozyme, 3 % de KCl, 0,5 % de CaCl<sub>2</sub> et 9 % de mannitol. Le pH des solutions enzymatiques est ajusté à 5,6. Les macérations sont placées sur un agitateur (30 tours/mn) à l'obscurité, à 27 °C pendant 14 h-16 h.

### **R**écupération des protoplastes

À l'issue de la digestion enzymatique, des prélèvements sont effectués afin de s'assurer de la présence et de la qualité des protoplastes.

Un simple contrôle sous microscope de la préparation réalisée permet de juger de l'efficacité du traitement de production des protoplastes. La macération est alors filtrée sur un double tamis de 100/25  $\mu\text{m}$  de diamètre de maille. La suspension de protoplastes est ensuite transférée dans des tubes de centrifugation. Les protoplastes sont récupérés après trois séries de rinçages par centrifugations de 5 mn chacune, à 650 tours/mn. Le milieu SA de rinçage des protoplastes est le suivant : 3 %  $\text{CaCl}_2$ , 0,5 % KCl.

### **Viabilité des protoplastes et synthèse de la paroi cellulaire**

Le test de viabilité est réalisé à l'aide de Fluoresceine di-acétate (FDA) (Widholm, 1972). La reconstitution de la paroi cellulaire est mise en évidence à l'aide du colorant Calcofluor White (Nagata et Takebe, 1970).

### **Culture des protoplastes**

Les protoplastes de bananiers sont cultivés à forte densité, sur une couche nourricière (Panis *et al.*, 1993 ; Megia *et al.*, 1993).

### **Préparation de la couche nourricière**

La couche nourricière se prépare 1 à 2 jours avant la mise en culture des protoplastes. Elle est conservée à 26 °C à l'obscurité. Elle est composée du milieu liquide MS plus 500  $\text{mg.l}^{-1}$  de glucose, 100  $\text{g.l}^{-1}$  de maltose, 10  $\text{g.l}^{-1}$  de saccharose, 45  $\text{mg.l}^{-1}$  de myoinositol, vitamines de Morel, de 2,5  $\text{mg.l}^{-1}$  d'acide 2,4 D dichlorophénoxyacétique (2,4 D). Ces milieux sont gélifiés par de l'agarose sea plaque (Sigma) à raison de 20  $\text{g.l}^{-1}$ . La couche nourricière contient des cellules en prolifération active, issues d'une suspension de cellules de bananier.

La couche nourricière se prépare de la manière suivante :

- préparer le milieu liquide MS modifié ci dessus décrit, à concentration double et le stériliser par filtration sur millipore de 0,22  $\mu\text{m}$  ;
- préparer une solution d'agarose : faire dissoudre la solution d'agarose à double concentration (soit 40  $\text{g.l}^{-1}$ ) dans de l'eau distillée. La solution d'agarose est ensuite stérilisée par autoclavage (120 °C pendant 30 mn) ;

- filtrer sur un double tamis de diamètre de mailles de 1 000/100  $\mu\text{m}$  la suspension de cellules nourricières et laisser décanter dans un tube stérile. Éliminer le surnageant et récupérer le culot cellulaire à l'aide d'une pipette stérile à large bec ;
- ajouter au milieu liquide MS modifié, les cellules décantées à raison de 3 à 6 % (volume/volume) ;
- attendre que la solution de l'agarose soit refroidie (30-35 °C). Ensuite, y ajouter le MS modifié contenant les cellules nourricières ;
- homogénéiser doucement le mélange par agitation manuelle, couler le mélange dans les boîtes de Pétri (5,5 cm de diamètre) à raison de 12 ml par boîte ;
- recouvrir la couche nourricière de la membrane millipore (0,8  $\mu\text{m}$ ) stérile ;
- déposer sur la membrane millipore environ 500 ml de suspension de protoplastes. Cette dernière contient 0,5.10<sup>6</sup>-10<sup>6</sup> protoplastes/ml, du milieu composé de sels de N<sub>6</sub> (Chu *et al.*, 1975), vitamines, acides organiques et sucres de Kao et Michayluk (1975), 70 g.l<sup>-1</sup> de glucose, 100 mg.l<sup>-1</sup> de MES, 250 mg.l<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et 10 g.l<sup>-1</sup> de saccharose.

### *Régénération des protoplastes*

Après 3 semaines environ, on observe sur la couche nourricière des microcolonies de cellules à cytoplasmes dense constituant les proembryons. Ces proembryons sont ensuite transférés en masse sur le milieu de régénération A<sub>0,4</sub>B<sub>0,5</sub> contenant 1/2 de sels de MS, vitamines de Morel, 0,4 mg.l<sup>-1</sup> d'acide 3-indole acétique (AIA), 0,5 mg.l<sup>-1</sup> de benzyladénine (BA), 30 g.l<sup>-1</sup> de saccharose, 4 g.l<sup>-1</sup> de gelrite (Sigma). Trois à quatre semaines après le transfert sur milieu de régénération A<sub>0,4</sub>B<sub>0,5</sub>, les proembryons s'épidermisent pour fournir des masses blanches lisses qui donneront des embryons. Ces embryons sont ensuite repiqués individuellement sur le même milieu à raison de 30 embryons par boîte de Pétri. Les plantules formées à partir des embryons sont repiquées sur le milieu de multiplication des plantes *in vitro*.

## Résultats

Les protoplastes ont été isolés à partir des suspensions cellulaires, des cals et des feuilles. Lorsque le matériel de base est une suspen-

sion cellulaire, le rendement peut atteindre  $23 \cdot 10^6$  protoplastes par ml de suspension cellulaire. La viabilité examinée lors de l'isolement des protoplastes varie entre 71 et 91 % (tabl. 1). Les protoplastes isolés à partir des suspensions cellulaires sont de taille très hétérogène (diamètre variant de 10 à 35  $\mu\text{m}$ ).

Génotype	<i>Grande Naine</i>	<i>Gros Michel</i>	<i>Currare Enano</i>	<i>Dominico</i>	<i>IRFA -903</i>	<i>SF-265</i>	<i>Col-49</i>
Génome	AAA	AAA	AAB	AAB	AA	AA	AA
Nombre ( $10^6/\text{ml}$ )	11,7 $\pm 6,4$	8,9 $\pm 5,1$	7,7 $\pm 7,2$	23,3 $\pm 12,6$	20,0 $\pm 14,7$	16,2 $\pm 19,5$	10,0 $\pm 10,5$
Viabilité (%)	85,3 $\pm 3,8$	89,4 $\pm 4,6$	76,8 $\pm 5,1$	91,0 $\pm 2,0$	82,4 $\pm 1,7$	71,0 $\pm 3,4$	84,6 $\pm 1,3$
Taille ( $\mu\text{m}$ )	15-35	10-25	20-35	15-35	10-25	15-35	10-35

Nombre de protoplastes obtenus à partir d'un millilitre de suspension cellulaire.

La viabilité des protoplastes est observée une heure après la procédure d'isolement.

A : Génome *acuminata*

B : Génome *balbisiana*

Tableau 1

Caractérisation des protoplastes de suspension cellulaire.

Lorsque les protoplastes sont isolés à partir des cals ou des feuilles le rendement est beaucoup plus faible. Il n'excède pas  $3 \cdot 10^6$  protoplastes/ml. Le taux de viabilité n'est que de 27-40 % (tabl. 2). Les protoplastes de mésophylles sont de taille beaucoup plus homogène que ceux des cals ou des suspensions cellulaires.

Après 8 jours de culture, 75-80 % des protoplastes ont reconstitué leur paroi. Les protoplastes ayant synthétisé leur paroi prennent alors une forme plus ou moins ovoïde. Cependant la division de ces

Génotype	<i>Pisang klutuk (c)</i>	<i>Pisang klutuk wulung (c)</i>	<i>Pisang Batu (c)</i>	<i>Pisang klutuk (f)</i>	<i>Tani (f)</i>	<i>Colatino Ouro (f)</i>
Génome	B	B	B	B	BB	AA
Rendement 10 <sup>6</sup> /g	1,7 ± 0,2.10 <sup>6</sup>	2,4 ± 2,3.10 <sup>6</sup>	2,8 ± 0,4.10 <sup>6</sup>	1,1 ± 0,7.10 <sup>6</sup>	1,2 ± 0,9.10 <sup>6</sup>	2,1 ± 1,3.10 <sup>6</sup>
Viabilité (%)	30 ± 1,7	30 ± 2,2	35 ± 5,7	31 ± 6,0	40 ± 3,5	27 ± 3,5
Taille (µm)	15-20	15-25	15-25	25-35	25-35	15-30

Nombre de protoplastes obtenu à partir d'un gramme de cal ou de feuille.

La viabilité des protoplastes est observée une heure après la procédure d'isolement.

A : Génome *acuminata*

B : Génome *balbisiana*

Tableau 2

Caractérisation des protoplastes de cals (c) et de mésophylles (f).

concentration des protoplastes mis en culture (5.10<sup>5</sup> à 10<sup>6</sup> protoplastes/ml). Les premières divisions apparaissent chez les cellules issues de protoplastes provenant des suspensions cellulaires, cinq à sept jours après leur mise en culture. En revanche, les protoplastes issus de cals et de mésophylles conduisent à des cellules qui ne se divisent pas. Ces dernières peuvent néanmoins rester en vie pendant près de 3 semaines sur la couche nourricière.

Afin d'optimiser les divisions des cellules issues des protoplastes puis la formation des proembryons, nous avons testé deux types de cellules nourricières de bananier : *Grande Naine (AAA)* et *IRFA 903 (AA)*. Pour tous les génotypes étudiés, la couche nourricière *Grande Naine (AAA)* favorise plus l'évolution des protoplastes et la formation des proembryons que la suspension cellulaire *IRFA 903 (AA)* (tabl. 3). Le taux de cellules en division par rapport au nombre de protoplastes mis en culture varie entre 9-16 % pour la couche nourricière *Grande Naine (AAA)* ; ce taux n'est que de 2-9 % lorsqu'on utilise la suspension cellulaire *IRFA 903 (AA)*. Le taux de formation des proembryons peut atteindre 9 % avec la cellule nourricière *Grande Naine (AAA)* ; il n'excède pas 2 % quand on utilise *IRFA 903 (AA)* comme cellule nourricière.

À l'étape « proembryon », la culture qui se développe sur la couche nourricière est très hétérogène. Comme le montre la figure 1, on observe à ce stade des protoplastes et des cellules isolées (30 %), des

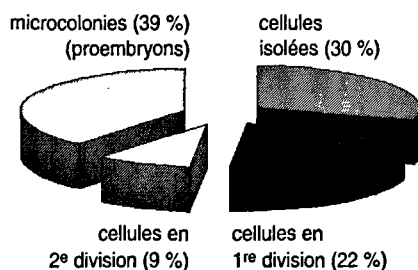


Génotype	Génome	Couche nourricière	Nombre de protoplastes/boîte de Pétri	Cellules en division/boîte de Pétri	Proembryons formés/boîte de Pétri
Grande	AAA	Grande Naine	0,5.10 <sup>6</sup>	80 000 (16 %)	18 000 (3,6 %)
Naine		IRFA 903	0,5.10 <sup>6</sup>	20 000 (4 %)	1 600 (0,3 %)
Gros	AAA	Grande Naine	0,5.10 <sup>6</sup>	70 000 (14 %)	10 000 (2 %)
Michel		IRFA 903	0,5.10 <sup>6</sup>	12 000 (2,4 %)	1 800 (0,4 %)
IRFA 903	AA	Grande Naine	0,5.10 <sup>6</sup>	60 000 (12 %)	15 000 (3 %)
		IRFA 903	0,5.10 <sup>6</sup>	35 000 (7 %)	4 700 (0,9 %)
Col 49	AA	Grande Naine	0,5.10 <sup>6</sup>	45 000 (9 %)	9 000 (1,8 %)
		IRFA 903	0,5.10 <sup>6</sup>	10 000 (2 %)	1 400 (0,3 %)
SF 265	AA	Grande Naine	0,5.10 <sup>6</sup>	125 000 (25 %)	43 000 (8,6 %)
		IRFA 903	0,5.10 <sup>6</sup>	45 000 (9 %)	2 300 (0,5 %)
Σ			5,0.10 <sup>6</sup>	502 000 (10 %)	108 800 (2 %)

A : Génome *acuminata*B : Génome *balbisiana*

I Tableau 3

Effet de la couche nourricière sur les premières divisions des cellules dérivées de protoplastes obtenus à partir des suspensions cellulaires de type *acuminata* et la formation des proembryons.



I Figure 1

Structures sur couche nourricière trois semaines après la mise en culture des protoplastes de bananiers.

cellules en premières divisions (22 %), des cellules en deuxième divisions (9 %) et des proembryons (39 %). Les proembryons formés sont laissés sur la couche nourricière ou transférés sur milieu de régénération A<sub>0,4</sub>B<sub>0,5</sub>. Dans les deux cas, les proembryons évoluent en embryons ; mais, sur la couche nourricière, les embryons appa-

raissent 6 mois après la mise en culture des protoplastes alors que, sur milieu  $A_{0.4}B_{0.5}$ , les premiers embryons se forment 2 mois après la mise en culture des protoplastes. De plus, le taux de formation des embryons est beaucoup plus élevé lorsque les proembryons sont transférés sur le milieu  $A_{0.4}B_{0.5}$ .

Le nombre de plantes régénérées varie selon le génotype. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les génotypes *Grande Naine* (AAA) (200 plantes) et *IRFA 903* (AA) (115 plantes) (tabl. 4).

Génotype	Génome	Nombre d'embryons	Nombre de plantules	Taux de régénération
<i>Grande Naine</i> (s)	AAA	273	200	73
<i>Gros Michel</i> (s)	AAA	140	43	31
<i>Currare enano</i> (s)	AAB	91	36	40
<i>SF 265</i> (s)	AA	95	77	81
<i>IRFA 903</i> (s)	AA	126	115	91
<i>Col 49</i> (s)	AA	329	54	16
<i>Colatino Ouro</i> (c)	AA	0	0	0
<i>Tani</i> (f)	BB	0	0	0
<i>Pisang Batu</i> (c)	B	0	0	0
<i>Pisang Klutuk</i> (c/f)	B	0	0	0
<i>Pisang Klutuk w.</i> (c)	B	0	0	0
Σ		1 045	525	50

A : Génome *acuminata*

B : Génome *balbisiana*

■ Tableau 4

Évolution morphogène des protoplastes de diverses origines (s = suspension cellulaire ; c = cal ; f = feuille).

## ■ Discussion

La mise en culture des protoplastes n'est envisageable que s'ils sont isolés en quantité suffisante. Le rendement des protoplastes et leur taux de viabilité à l'isolement dépendent en grande partie du matériel de base. D'une manière générale, lorsque des suspensions cellulaires sont utilisées comme source d'isolement de protoplastes, le

rendement et le taux de viabilité sont très élevés (tabl. 1). Par contre, ce rendement est faible quand les protoplastes sont issus de cals ou de feuilles (tabl. 2). De même, le taux de viabilité des protoplastes issus de cal ou de feuille est largement inférieur à celui des protoplastes de suspension cellulaire (tabl. 1 et 2).

Dans nos expérimentations, seuls les protoplastes issus de suspensions cellulaires embryogènes sont capable d'évoluer favorablement. La perte de pouvoir de division des protoplastes de feuilles et de cals peut s'expliquer par le fait que, étant très fragiles, ils ne résistent pas à la macération enzymatique. Ces résultats montrent que les suspensions cellulaires constituent le matériel idéal pour l'obtention et la culture des protoplastes chez le bananier. Ceci a été démontré chez les autres monocotylédones comme le riz (Datta *et al.*, 1992) (Jain *et al.*, 1996), le maïs (Prioli et Söndahl, 1989), le blé (Vasil *et al.*, 1990), l'orge (Funatsuki *et al.*, 1992). Pour une meilleure exploitation des protoplastes du bananier, il importe de concentrer les efforts sur le développement d'une méthode reproductible permettant l'établissement des suspensions cellulaires embryogènes chez toutes les variétés importantes.

Les protoplastes du bananier, comme ceux de la plupart des monocotylédones, sont considérés comme récalcitrants. Leur culture pose en effet de nombreux problèmes. L'entrée en division des cellules issues des protoplastes de bananier nécessite pour l'instant l'utilisation des cellules nourricières. La comparaison de l'effet des deux génotypes de cellules nourricières *Grande Naine* (AAA) et *IRFA 903* (AA) sur la division des cellules dérivant des protoplastes et la formation des proembryons révèle que la couche nourricière *Grande Naine* (AAA) est plus favorable pour la division des cellules issues des protoplastes, ainsi que pour leur évolution en proembryons, que celle du génotype *IRFA 903* (AA) (tabl. 3). Ceci peut être mis en rapport avec la structure cellulaire de ces deux suspensions, compte tenu du fait que la suspension *Grande Naine* (AAA) est plus riche en cellules embryogènes non organisées en structures embryoides que celle du génotype *IRFA 903* (AA) et que sa vitesse de croissance est supérieure.

Le mécanisme de l'effet des cellules nourricières sur l'évolution morphogène des protoplastes est mal connu. Selon Karp et Lazzeri (1992), les cellules nourricières produiraient des substances non définies « growth-promoting-factors: GPF » qui stimuleraient les

divisions cellulaires. Une autre hypothèse considère que les protoplastes produisent par l'intermédiaire de débris, d'excréments, des « growth-inhibitor-factors: GIF » qui gêneraient leur évolution s'ils n'étaient pas neutralisés par les GPF.

Ces études ont permis de montrer que les cellules nourricières sont nécessaires au développement des protoplastes jusqu'à l'apparition des microcolonies. Il semblerait que les cellules nourricières ont un effet de blocage partiel sur l'évolution des microcolonies (proembryons), puisque très peu de microcolonies évoluent en embryons lorsqu'elles sont laissées sur la couche nourricière. Les microcolonies sont désormais transférées sur le milieu de régénération immédiatement après leur formation.

L'évolution morphogène des protoplastes en plantes n'est observée que lorsque le matériel d'origine est une suspension cellulaire embryogène. Toutefois, on note un effet génotype dans la régénération. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le génotype *Grande Naine (AAA)* (tabl. 4). Ces résultats peuvent être mis en rapport avec la qualité de la suspension cellulaire. C'est en effet celle qui produit directement plus de plantes par unité de volume parmi les suspensions dont nous disposons.

## Conclusion

Lors de ces travaux, nous avons augmenté le nombre de génotypes de bananier capables de fournir des protoplastes aptes à régénérer des plantes. Par ailleurs, nous avons considérablement amélioré le taux de conversion des proembryons en plantes en modifiant les protocoles établis par nos prédécesseurs, c'est-à-dire en transférant de façon précoce les proembryons sur milieu de régénération et en subcultivant ces proembryons individuellement sur le même milieu de régénération.

### Remerciements

Ces travaux ont été financés par l'Union européenne (Inco DC, contrat n° IC18-CT97-0204).

## Bibliographie

Bakry F 1984 —

Choix du matériel à utiliser pour l'isolement de protoplastes de bananier (*Musa sp.*). *Fruits* 39 (7-8) : 449-452.

Bakry F, Horry JP 1992 —

Tetraploid hybrids from interplaid 3x X 2x crosses in cooking bananas. *Fruits* 641-647.

Chu CC, Wang CC, Sun CS 1975 —

Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen source. *Scientia Sinica XVII* (5) : 659-668.

Côte F, Domergue R,

Monmarson S, Schwendiman J, Teisson C, Escalant JV 1996 — Embryogenic cell suspensions from the male flower of *Musa AAA cv. Grande Naine*. *Physiol Plant* 97 : 285-290.

Datta K, Potrikus I, Datta SK 1992 —

Efficient fertile plant regeneration from protoplasts of the Indica rice breeding line IR72 (*Oryza sativa L.*). *Plant Cell Rep* 11 : 229-233.

Dhed'a D, Dumortier F, Panis B,

Vuylsteke D, De Langhe E 1991 — Plant regeneration in cell suspension cultures of cooking banana *cv. "Bluggoe"* (*Musa spp. ABB group*). *Fruits* 46 : 125-135.

Funatsuki H, Lörz H, Lazzeri PA 1992 —

Use of feeder cells to improve barley protoplast culture and regeneration. *Plant Sci* 85 : 179-187.

Grapin A,

Schwendiman J, Teisson C 1996 — Somatic embryogenesis in plantain banana. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 32 : 66-71.

Jain S, Jain RK, Wu R 1996 —

A simple and efficient procedure

for cryopreservation of embryogenic cells of aromatic Indica rice varieties. *Plant Cell Rep* 15 : 712-717.

Kao KN, Michayluk MR 1975 —

Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquide media. *Planta* 126 : 105-110.

Karp A, Lazzeri PA 1992 —

Regeneration stability and transformation in barley. In : Shewry PR (ed) *Barley: Genetic, molecular biology and biotechnology* CAB International, Oxford, pp 512-572.

Kerbelec F 1996 —

Établissement d'une technique d'androgenèse pour l'amélioration génétique du bananier (*Musa sp.*). Thèse de doctorat, École nationale agronomique de Rennes.

Ma SS 1991 —

Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension culture of banana. In : Department of agriculture, National Taiwan university (ed.) *Proceedings of symposium on tissue culture of horticultural crops, Taipei, Taiwan, 8-9 March, 1988*, pp 181-188.

Marroquin CG, Paduscheck C,

Escalant JV, Teisson C 1993 — Somatic Embryogenesis and plant regeneration through Cell Suspensions in *Musa acuminata*. *In Vitro Cell Dev Bio* 29 : 43-46.

Matsumoto K, Crepy L,

Teixeira JB, Ferreira FR 1988 — Isolation, culture and fusion of banana bract protoplast. In : International Rice Research Institute (Irri) and Academia Sinica (eds) *Genetic Manipulation in Crop*. Cassell Tycool, Phyladelphia, USA pp 414-415.

Megia R, Haicour R, Tizroutine S, Bui Trang V, Rossignol L, Sihachakr D, Schwendiman J. 1993 — Plant regeneration from cultured protoplasts of the cooking banana cv. *Bluggoe* (*Musa* spp., *ABB* group) *Plant Cell Rep* 13 : 41-44.

Möllers C, Wenzel G 1992 — Somatic hybridisation of dihaploid potato protoplasts as a tool for potato breeding. *Bot Act* 105 : 133-139.

Morel G, Wetmore RH 1951 — Fern callus tissue culture. *Am J Bot* 38 : 141-143.

Murashige T, Skoog F 1962 — A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15 : 473-497.

Nagata T, Takebe I 1970 — Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts. *Planta* 92 : 301-308.

Novak FJ, Afza R, Van Duren M, Perea-Dallos M, Conger BV, Xiaolang T 1989 — Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (*AA* and *AAA*) and cooking (*ABB*) banana (*Musa* spp.). *Bio/Technol* 7 : 154-159.

Panis B, Wauwe AW, Swennen R 1993 — Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from protoplasts of banana (*Musa* spp.). *Plant Cell Rep* 12 : 403-407.

Perrier X 1992 — Numerical Analysis of Genetic Diversity in Banana. In : Ganry J (ed.) *Breeding Banana and Plantain for Resistance to Diseases and Pests. Proceeding of the International Symposium on Genetic Improvement of Bananas for Resistance to Diseases and Pests.* Cirad-FIhor Montpellier (France), pp 23-34.

Prioli LM, Söndahl MR 1989 — Plant regeneration and recovery of fertile plant from protoplasts of maize (*Zea mays* L.). *Bio/Technol* 7 : 589-594.

Stover RH, Simmonds NW 1987 — *Banana* (Third edition). Longman Scientific and Technical, Essex (England).

Vasil V, Redway F, Vasil IK 1990 — Regeneration of plant from embryogenic suspension culture protoplasts of wheat (*Triticum aestivum* L.) *Bio/Technol* 8 : 429-434.

Vuyksteke D, Swennen R, Ortiz R 1993 — Development and performance of black sigatoka -resistance tetraploid hybrids of plantains (*Musa* spp. *AAB* Group). *Euphytica* 65 : 33-42.

Widholm JM 1972 — The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining of viability of cultured plant cells. *Stain Technol* 47 : 189-194.